

Aus dem Institut für vegetative Physiologie
der Universität in Frankfurt/M.,
Direktor: Prof. Dr. med. E. Heinz

**Untersuchungen über den
Wirkungsmechanismus der Gluconeogenese
nach Cortisolgabe bei Ratten*)**

Inaugural-Dissertation

zur
Erlangung des Doktorgrades
der
gesamten Medizin
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Johann-Wolfgang-Goethe-Universität
Frankfurt/Main

vorgelegt von

Eckehart Wiedemann
aus Eisenach

Frankfurt/Main 1962

*) Mit Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft

1963

Aus dem Institut für vegetative Physiologie
der Universität in Frankfurt/M.,
Direktor: Prof. Dr. med. E. Heinz

**Untersuchungen über den
Wirkungsmechanismus der Gluconeogenese
nach Cortisolgabe bei Ratten*)**

Inaugural-Dissertation

zur
Erlangung des Doktorgrades
der
gesamten Medizin
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Johann-Wolfgang-Goethe-Universität
Frankfurt/Main

vorgelegt von

Eckehart Wiedemann
aus Eisenach

Frankfurt/Main 1962

*) Mit Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft



Dekan: Prof. Dr. med. W. Krücke

Referent: Prof. Dr. med. L. Róka

Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. A. Wacker

Mündliche Prüfung: 23. April 1963

Dem Andenken
meines verehrten Lehrers,
Privatdozent Dr. med. H. J. HÜBENER,
in Dankbarkeit gewidmet.

Inhaltsverzeichnis.

	Seite:
EINLEITUNG	1
MATERIAL UND METHODEN	2
ERGEBNISSE	6
A. Abhängigkeit der Gluconeogenese von der Cortisoldosis	6
B. Einfluß von Antimetaboliten des Protein- und Nucleinsäurestoff- wechsels	8
C. Veränderungen des Protein- und Aminosäuregehaltes der Leber während der Gluconeogenese	15
DISKUSSION	18
ZUSAMMENFASSUNG	24
LITERATURVERZEICHNIS	25

Im Text verwendete Akürzungen.

AMP	=	Adenosinmonophosphat
AS	=	Aminosäure
ATP	=	Adenosintriphosphat
DNS	=	Desoxyribonucleinsäure
i. p.	=	intraperitoneal
LFG	=	Leberfeuchtgewicht
m-RNS	=	messenger-Ribonucleinsäure
μ Mol	=	10^{-6} Mol
nMol	=	10^{-9} Mol
RNS	=	Ribonucleinsäure
s-RNS	=	lösliche Ribonucleinsäure
TP	=	Tryptophanpyrrolase

EINLEITUNG.

Unter den Hormonen, die in der Nebennierenrinde gebildet werden, zeichnet sich Cortisol durch seinen großen Einfluß auf den Kohlenhydrat- und Eiweißstoffwechsel aus. Es bewirkt eine Neubildung von Glucose, also eine Gluconeogenese, aus körpereigenen Proteinen (39). Dieser Vorgang ist von großer biologischer Bedeutung, da er den Organismus befähigt, auch bei länger anhaltenden Belastungen und im Hungerzustand den Blutzuckerspiegel auf seiner normalen Höhe zu halten.

Die Gluconeogenese äußert sich einerseits in einer Vermehrung der Glycogenvorräte in Leber und Muskulatur (9), andererseits in einer erhöhten Stickstoffausscheidung im Harn (42), die eine negative Stickstoffbilanz zur Folge hat. Auf welche Weise Cortisol diese Stoffwechselumstellung herbeiführt und wo sein primärer Angriffspunkt liegt, ist nicht bekannt. In den letzten Jahren scheint jedoch die Lösung des Problems nähergerückt zu sein. 1959 wurde nachgewiesen, daß Cortisol in der Leber die Bildung der Tryptophanpyrrolase hervorruft (14,23), eines Fermentes, das Tryptophan zu Kynurenin abbaut. Die Kinetik dieser Enzyminduktion weist, wie HÜBENER und Mitarbeiter 1961 zeigen konnten (18), eine auffallende Ähnlichkeit mit der nach Cortisolgabe erfolgenden Leberglycogenzunahme auf. Der Anstieg sowohl der Tryptophanpyrrolase als auch des Glycogens erfolgen erst, nachdem das Cortisol in der Leber seine höchste Konzentration bereits überschritten hat, und kann durch Aminosäureantimetaboliten fast vollständig unterdrückt werden. Aus diesen und anderen Befunden (34,35) folgerte HÜBENER, daß die primäre Wirkung des Cortisols in einer Enzyminduktion, d. h. einer Neubildung von Enzymen, bestehe, die ihrerseits die Umwandlung von körpereigenen Proteinen in Glucose hervorrufen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, durch experimentelle Untersuchungen weitere Anhaltspunkte für die Richtigkeit dieser Annahme zu gewinnen. Insbesondere sollte versucht werden, aus dem Einfluß, den spezifische Hemmstoffe der Proteinsynthese auf die Gluconeogenese ausüben, Rückschlüsse auf den vermutlichen Angriffspunkt des Cortisols in der Reaktionskette der Proteinsynthese

zu ziehen. Im Verlauf unserer Experimente zutagegetretene Ergebnisse veranlaßten uns darüber hinaus, einigen Veränderungen im Protein- und Aminosäuregehalt der Leber nach Cortisolgabe nachzugehen.

MATERIAL UND METHODEN.

Alle Versuche wurden mit etwa 100 g schweren männlichen Albino-Ratten ausgeführt. Einige von ihnen wurden auf die übliche Weise adrenalectomiert, erhielten an den beiden auf die Operation folgenden Tagen 1%-ige Kochsalzlösung und Futter ad libitum und mußten dann, wie auch die übrigen Tiere, 24 Stunden hungern.

Nach dem Fasten erhielten die Ratten Cortisol (meist 5 mg/100 g Körpergewicht) in Form einer durch zwei Minuten lange Beschallung mit dem Ultraschallgerät hergestellten Kristallsuspension in isotonischer Kochsalzlösung. Die Kontrolltiere bekamen stattdessen das gleiche Volumen isotonische Kochsalzlösung.

Die Antimetaboliten wurden jeweils zu verschiedenen Zeiten und in verschiedenen Dosen vor bzw. nach Cortisolgabe verabreicht. Ihre Wirkung wurde zumeist an mehreren Versuchsgruppen untersucht, in denen sich jeweils eine Anzahl Tiere befand, die Cortisol, aber keinen Hemmstoff bekamen, und als Kontrollen dienten. Die Mittelwerte dieser Kontrollen unterschieden sich nie um mehr als 25 % von den entsprechenden Mittelwerten aller von uns untersuchten Ratten und wurden daher in den Tabellen nicht aufgeführt.

Kochsalzlösung, Cortisol und die meisten Antimetaboliten wurden mit der Schlundsonde, die übrigen Hemmstoffe durch intraperitoneale Injektion verabfolgt.

Nach Versuchsende wurden die Ratten durch einen Schlag auf den Kopf getötet und mittels Durchtrennung der Halsgefäße ausgeblutet. Die Leber wurde unverzüglich entnommen und in mehrere Teile zerlegt. Das zur Glycogenanalyse bestimmte Stück wurde in Trichloressigsäure gebracht und alsbald verarbeitet. Die übrigen Stücke wurden sofort in vorgewogene Wassermannröhrchen gefüllt,

in Kohlensäureschnee eingefroren, gewogen und bis zur Aufarbeitung bei -30°C in der Tiefkühltruhe aufbewahrt.

Bestimmung des Leberglycogens.

Das Leberglycogen wurde ohne Abänderungen mit der Anthronreaktion nach CARROL, LONGLEY und ROE bestimmt (12).

Bestimmung der TP.

Die TP wurde im wesentlichen nach CIVEN und KNOX (14) bestimmt. Die gefrorene Leber wurde bei 0°C mit dem 14-fachen Volumen Tris-Puffer (0,05 M/l; p_{H} 7,3) im Teflon-Homogenisator homogenisiert. 2 ml Homogenat wurden mit 3 ml Kaliumphosphat-Puffer (0,1 M/l; p_{H} 7,3) und 1 ml (L)-Tryptophan als Substrat in 50-ml-Erlenmeyerkölbchen eine Minute lang mit Sauerstoff durchströmt. Der Kolben wurde sodann mit einem Siliconstopfen verschlossen und eine Stunde lang bei 37°C in einem mit einer Schüttelleinrichtung versehenen Wasserbad inkubiert. Danach wurde der Kolbeninhalt in ein Wassermannröhrchen übergeführt, in welchem die enzymatische Reaktion sofort durch Zugabe von 0,8 ml 45%-iger Perchlorsäure gestoppt wurde. Es wurde mit 2 ml Kaliumphosphat-Puffer nachgespült, 10 Minuten bei 4000 Umdrehungen/Minute zentrifugiert, dekantiert und mit 1 ml 4n KOH und 1 ml 3,45m KHCO_3 neutralisiert. Das ausgefallene KClO_4 wurde bei 4°C in der Kühlzentrifuge abzentrifugiert. Der Überstand wurde in eine Quarzküvette gefüllt und die Extinktion bei 366 nm, dem Absorptionsmaximum des Kynurenins, am Zeiss-Spektrophotometer abgelesen. Als Leerwerte wurden bei jeder Bestimmungsserie einige Ansätze verwandt, die anstatt Tryptophan H_2O enthielten, sonst aber völlig gleich behandelt wurden. Die Aktivität wurde nach folgender Formel berechnet:

$$c_{\text{TP}} = 10^9 \cdot f \cdot \frac{E}{k \cdot d \cdot t}$$

Hierbei bedeuten:

- c_{TP} = Aktivität in nMol/Minute/g LFG
 f = Verdünnungsfaktor
 E = Extinktion der Probe minus Extinktion des Leerwertes
 k = molarer dekadischer Extinktionskoeffizient des Kynurenins = $5,02 \cdot 10^6$
 d = Durchmesser der verwendeten Quarzküvette in cm
 t = Bebrütungszeit des Ansatzes in Minuten

Der Verdünnungsfaktor f wird folgendermaßen berechnet:

$$f = \frac{A \cdot (F + G)}{x \cdot G}$$

Dabei ist

- A = Volumen des Ansatzes, nachdem alle Reagenzien zugesetzt sind (ml)
- F = Volumen des zum Homogenisieren benutzten Puffers (ml)
- G = Feuchtgewicht des homogenisierten Leberstückes (g)
- x = Volumen des bebrüteten Homogenats (ml).

Proteinbestimmung.

Das Gesamtprotein wurde aus dem zur Bestimmung der TP hergestellten Homogenat durch Ausfällung mit einem gleichen Volumen 10%-iger Trichloressigsäure gewonnen. Es wurde zentrifugiert und der Überstand verworfen. Im Sediment enthaltene Lipide wurden mit einem Gemisch aus zwei Teilen Äther und je einem Teil Aceton und Äthanol extrahiert. Nach nochmaligem Zentrifugieren und Verwerfen des Lösungsmittels wurde das gereinigte Protein in 2,5 ml H_2O gelöst und mit 2,5 ml Biuretreagenz nach WEICHSELBAUM (2) zur Reaktion gebracht. Nach 30 Minuten wurde bei 526 nm die Extinktion in einer Glasküvette gemessen und die entsprechende Proteinmenge nach folgender Formel berechnet:

$$c_P = \frac{b \cdot (F + \frac{G}{s})}{d \cdot x \cdot G}$$

Hierbei bedeuten:

- c_P = mg Protein/g LFG
- b = Biuretfaktor = 16,5 bei Verwendung von 2,5 ml Biuretreagenz
- F = Volumen des zum Homogenisieren benutzten Puffers (ml)
- G = Feuchtgewicht des homogenisierten Leberstückes (g)
- s = spezifisches Gewicht der Leber
- d = Durchmesser der verwendeten Glasküvette
- x = Volumen der zur Proteinausfällung benutzten Homogenatprobe (ml)

Zur Gewinnung des cytoplasmatischen Albumins wurde die Leber im 50-fachen Volumen Tra-Puffer (0,01 M/l; p_H 7,2) homogenisiert. Das Homogenat wurde 10 Minuten bei 7000 Umdrehungen/Minute zentrifugiert. Zu einer Probe des Überstandes wurde das gleiche

Volumen gesättigter Ammoniumsulfatlösung langsam unter Schütteln hinzugegeben. Nach zweistündigem Stehenlassen wurde das ausgefallene Globulin abzentrifugiert, der Überstand dekantiert und das darin gelöste Albumin, wie oben beschrieben, mit Trichloressigsäure ausgefällt. Nach Zentrifugieren und Verwerfen des Überstandes wurde das Sediment zur Entfernung überschüssigen Ammoniumsulfats mit 5%-iger Trichloressigsäure mehrere Male ausgewaschen. Danach wurde das Sediment von Lipiden gereinigt und mittels der oben angegebenen Biuretreaktion quantitativ bestimmt.

Bestimmung der Aminosäuren.

Die Bestimmung der Aminosäuren wurde in veränderter Form nach MOORE und STEIN (44,45) vorgenommen.

Die Leber wurde bei 0° C mit dem Teflon-Homogenisator im hundertfachen Volumen Tris-Puffer (0,05 M/l; p_H 7,2) oder 6%-iger Perchlorsäure homogenisiert. Das Homogenat wurde 10 Minuten lang bei 4° C und 5000 Umdrehungen/Minute in Wassermannröhrchen, die mit Kunststoffkappen verschlossen wurden, zentrifugiert. Der Überstand wurde zur Bestimmung der Aminosäuren verwandt. Vergleichende Untersuchungen ergaben bei Verwendung des Perchlorsäure-Überstandes um 10 % höhere Aminosäurewerte.

0,2 ml des Überstandes und 1 ml Ninhydrin-Reagenz wurden in ein Reagenzglas pipettiert und gut vermischt. Das Glas wurde dann mit einem Glasstopfen verschlossen und genau 15 Minuten im siedenden Wasserbad erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde die Lösung mit 50%-igem Äthanol etwa 50- bis 100-fach verdünnt. Dabei wurde der Wandbeschlag sorgfältig in das Innere des Glases gespült. Dieses wurde danach 15 Sekunden lang heftig geschüttelt. Anschließend wurde innerhalb einer Stunde am Zeiss-Spektrophotometer die Extinktion bei 570 nm gemessen. Als Leerwerte dienten Ansätze, die statt des Überstandes Tris-Puffer bzw. Perchlorsäure enthielten. Aus der Extinktion wurde an Hand einer Eichkurve, die mit Alanin hergestellt worden war, der Aminosäuregehalt der Proben ermittelt. Er wurde in $\mu M/g$ LFG umgerechnet. Von jedem Überstand wurden jeweils drei bis vier Proben gleichzeitig bestimmt.

Das Ninhydrin-Reagenz wurde für jede Bestimmungsserie folgendermaßen frisch hergestellt: 2 g Ninhydrin und 300 mg Hydrindantin

wurden in 75 ml Methylzellosolve gelöst. 25 ml Azetat-Puffer (4n; p_H 5,0) wurden hinzugefügt. Diese Lösung wurde in eine braune Flasche gefüllt und 30 Minuten lang mit Stickstoff durchströmt. Danach wurde sie innerhalb einer halben Stunde verbraucht.

Bestimmung der Leber-Peptidasenaktivität.

Die eingefrorene Leber wurde bei 0° C im Teflon-Homogenisator mit dem 15-fachen Volumen Tris-Puffer (0,05 M/l; p_H 7,2) homogenisiert. 2 ml Homogenat wurden mit 6 ml Natriumphosphat-Puffer (0,05 M/l; p_H 7,3) und 0,08 ml $MgCl_2$ (0,1 M/l) in einem 50-ml-Erlenmeyerkolben eine Minute lang mit einem Gemisch aus 95 % Sauerstoff und 5 % Kohlendioxyd durchströmt. Der Kolben wurde mit einem Siliconstopfen verschlossen und 30 Minuten lang bei 37° C im Wasserbad, das mit einer Schütteleinrichtung versehen war, inkubiert. Vor dem Durchströmen und nach dem Bebrüten wurden jeweils 2 ml des Kolbeninhalts mit 2 ml 6%-iger Perchlorsäure versetzt. Es wurde zentrifugiert und aus dem Überstand der Aminosäuregehalt bestimmt. Die Differenz des Aminosäuregehaltes vor und nach dem Bebrüten wurde als Maß für die Peptidasenaktivität angesehen und in μ Mol/Minute/g LFG ausgedrückt. Diese Bestimmungen wurden jeweils doppelt ausgeführt.

ERGEBNISSE.

A. Die Abhängigkeit der Gluconeogenese von der Cortisoldosis.

In einer ersten Versuchsreihe studierten wir den Einfluß verschieden hoher Cortisoldosen auf die Gluconeogenese. Dadurch sollte geklärt werden, ob mit der bei den bisherigen Untersuchungen über den Mechanismus der Cortisolwirkung (18,34) verabfolgten Dosis von 5 mg/100 g Rattengewicht Effekte erzielt werden, die sich von der physiologischen Gluconeogenese grundsätzlich unterscheiden.

Es wurden hintereinander drei Gruppen zu je 15 Tieren untersucht. Von diesen bekamen jeweils drei Ratten 2,5; 5; 10 bzw. 15 mg/100 g Körpergewicht, während drei weitere als Kontrollen ohne Cortisol dienten. Sämtliche Dosen wurden ausgezeichnet vertragen. Selbst die Tiere, die die größte Cortisolgabe er-

halten hatten, ließen in ihrem Verhalten keinen Unterschied gegenüber den Kontrollen erkennen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengefaßt und in Figur 1 graphisch dargestellt.

Tabelle 1

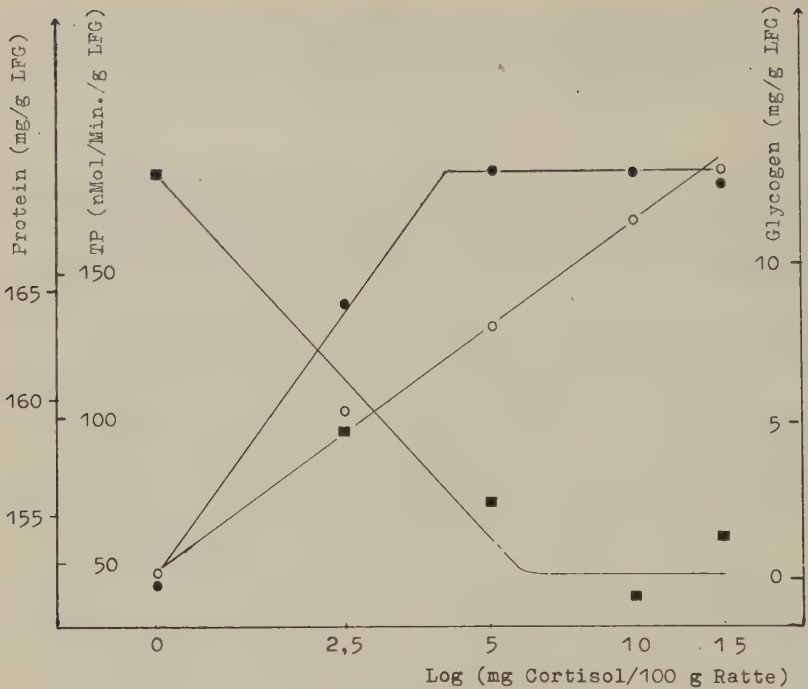
Einfluß verschiedener Cortisoldosen auf den Glycogen- und Proteingehalt sowie die TP-Aktivität der Rattenleber. Nach 24-stündigem Fasten bekamen die Ratten die angegebenen Cortisoldosen durch die Schlundsonde und wurden nach weiteren fünf Stunden getötet. Es sind jeweils die Mittelwerte $\pm 2s$ angeführt. In Klammern ist die Anzahl der Tiere angegeben.

Dosis mg/100 g	Glycogen mg/g LFG	TP nMol/Min./g LFG	Protein mg/g LFG
0,0	0,00 (9)	44 $\pm$ 34 (9)	169,7 $\pm$ 25,9 (9)
2,5	5,19 $\pm$ 4,16 (9)	139 $\pm$ 48 (9)	158,6 $\pm$ 30,2 (9)
5,0	7,81 $\pm$ 5,68 (35) ^{x)}	185 $\pm$ 111 (21) ^{x)}	155,3 $\pm$ 39,4 (9)
10,0	11,12 $\pm$ 10,24 (9)	184 $\pm$ 50 (9)	151,1 $\pm$ 22,5 (9)
15,0	12,60 $\pm$ 13,20 (9)	177 $\pm$ 51 (9)	153,8 $\pm$ 28,6 (9)

^{x)} Mittelwert aller von uns untersuchten Tiere.

Es zeigte sich, daß das Leberglycogen im gesamten geprüften Bereich linear zum Logarithmus der Dosis ansteigt. Dagegen wächst die TP-Aktivität nur bis zu 5 mg Cortisol, während sie dann konstant bleibt. In analoger Weise nimmt das Leberprotein bis zur gleichen Dosis geradlinig ab und hält sich im weiteren Verlauf auf der gleichen Höhe.

Aus dem linearen Anstieg des Glycogens kann man schließen, daß sich die Gluconeogenese unter dem Einfluß der von uns verwendeten Dosen lediglich quantitativ von der unter natürlichen Bedingungen stattfindenden unterscheidet. Die Dosis von 5 mg/100 g erscheint für unsere Untersuchungen besonders geeignet, da sie einerseits den TP-Anstieg und die Proteinabnahme bereits maximal stimuliert und auch eine hohe und damit methodisch gut erfassbare Glycogenbildung veranlaßt, andererseits aber noch im Bereich des linearen Anstiegs bzw. Abfalls der drei von uns bestimmten Größen liegt. Wir haben daher bei allen im folgenden beschriebenen Experimenten diese Dosis angewendet.



Figur 1

Dosiswirkungskurve des Cortisols. Vgl. hierzu Tabelle 1.

■ Protein, o Glycogen, ● TP.

B. Der Einfluß von Antimetaboliten des Protein- und Nucleinsäurestoffwechsels auf die Gluconeogenese.

Wenn die Gluconeogenese nach Cortisolgabe wirklich durch eine Enzyminduktion, also eine De-novo-Synthese von Enzymprotein, ausgelöst wird, so muß sie durch Stoffe, die die Proteinsynthese hemmen, beeinträchtigt werden. Als solche Substanzen kommen zum Beispiel synthetisch hergestellte Aminosäure-Analoga in Betracht. In der Tat ist es gelungen, mit einer Anzahl derartiger Aminosäure-Antimetaboliten die Glycogenbildung zu hemmen (18,34).

Da die Proteinsynthese vom Nucleinsäurestoffwechsel gesteuert

wird, darf man auch von Hemmstoffen der Nucleinsäuresynthese eine Wirkung auf die Enzyminduktion erwarten. Wir haben daher den Einfluß einer Reihe DNS- und RNS-Antimetaboliten auf die Gluconeogenese geprüft. Dabei hofften wir, auf Grund der Kenntnis des Angriffsortes dieser Stoffe in der Reaktionskette der Proteinsynthese einen Hinweis auf den mutmaßlichen Angriffsort des Cortisols in diesem Geschehen zu bekommen.

1. Äthionin.

Wie bereits früher gezeigt werden konnte, kann man die nach Cortisolgabe erfolgende Zunahme des Leberglycogens vollkommen unterdrücken, wenn man den Versuchstieren innerhalb einer Stunde nach der Cortisolapplikation Äthionin füttert (18,34). Der Grund hierfür dürfte in der chemischen Ähnlichkeit des Äthionins mit dem Methionin zu suchen sein. Vermutlich kann es an Stelle des Methionins in Protein eingebaut werden (56). Es könnte aber auch durch eine stabile Bindung an ein Enzym die Inkorporation des Methionins in Protein blockieren. In beiden Fällen könnte es sich um eine kompetitive Hemmung infolge Substratkonkurrenz handeln. Wir haben daher versucht, die äthioninbedingte Hemmung der Gluconeogenese durch Methionin aufzuheben. Das Ergebnis ist in Tabelle 2 verzeichnet.

Tabelle 2

Aufhebung der durch Äthionin verursachten Hemmung der Gluconeogenese durch Methionin. L(+)-Äthionin (0,8 ml = 0,16 M/l) wurde jeweils 30 Minuten, L(+)-Methionin (je 0,5 ml = 0,43 M/l) jeweils 15, 60 und 105 Minuten nach Cortisolgabe (5 mg/100 g) per Schlundsonde verabreicht. Es sind die Mittelwerte von je zwei Tieren angegeben.

	Glycogen		T P	
	mg/g	%	nMol/Min./g	%
Cortisol	7,18	100	163	100
Methionin	0,46	6	48	29
Cortisol + Methionin	2,77	39	152	94
Cortisol + Äthionin	1,31	18	37	23
Cortisol + Äthionin + Methionin	2,72	38	121	75

Wie die Ergebnisse zeigen, kann die durch Äthionin hervorgerufene Hemmung der TP durch Methionin vollständig aufgehoben werden. Die Aufhebung der Äthioninwirkung auf die Glycogenbildung ist nicht so deutlich nachweisbar, da Methionin die Gluconeogenese selbst auch hemmt. Immerhin ist nach Gabe von Cortisol + Äthionin + Methionin die Glycogenbildung doppelt so hoch wie nach Cortisol + Äthionin allein und ebenso hoch wie nach Cortisol + Methionin allein. Das bedeutet, daß Methionin auch die Wirkung des Äthionins auf die Gluconeogenese völlig unterdrücken kann.

Diese Befunde sprechen dafür, daß Äthionin den Einbau von Methionin in Protein kompetitiv hemmt, und machen eine unspezifische Wirkung des Äthionins auf die Gluconeogenese unwahrscheinlich.

2. Nucleinsäure-Antimetaboliten.

Im weiteren Verlauf unserer Untersuchungen haben wir den Einfluß von Mitomycin C, 5-Brom-Desoxyuridin, 5-Fluor-Uracil, 6-Aza-Uridin und 2-Thio-Uracil auf die Gluconeogenese geprüft. Alle diese Substanzen greifen in den Nucleinsäurestoffwechsel ein.

5-Brom-Desoxyuridin und 6-Aza-Uridin sind Nucleoside von 5-Brom-Uracil bzw. 6-Aza-Uracil, die sich ebenso wie 5-Fluor-Uracil und 2-Thio-Uracil durch entsprechende Substituierungen von dem natürlichen Nucleinsäurebaustein Uracil ableiten lassen. Die chemische Struktur des Antibioticums Mitomycin C ist dagegen bisher noch unbekannt.

Wie in der Diskussion noch näher ausgeführt wird, beeinflussen Mitomycin C ausschließlich, 5-brom-Desoxyuridin und 5-Fluor-Uracil ganz vorwiegend den DNS-Stoffwechsel. Diese Stoffe ließen weder eine Hemmwirkung auf den TP- noch auf den Glycogenanstieg nach Cortisolgabe erkennen (Tabelle 3).

Dagegen zeigten 6-Aza-Uridin und 2-Thio-Uracil, die beide ganz vorwiegend auf den RNS-Stoffwechsel wirken, einen, wenn auch unterschiedlichen, Einfluß auf die Glycogen- und TP-Bildung. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 verzeichnet.

Nach 6-Aza-Uridin ist keine Verminderung der Leberglycogenbildung erkennbar. Eine leichte Hemmung der TP ist jedoch nachweisbar. Bei allen 14 Tieren, die 6-Aza-Uridin bekommen hatten,

Tabelle 3

Einfluß von Mitomycin C, 5-Brom-Desoxyuridin und 5-Fluor-Uracil auf die Gluconeogenese und die TP-Induktion. Zum Zeitpunkt 0 bekamen die Ratten 5 mg Cortisol/100 g Körpergewicht und wurden 5 Stunden danach getötet. In Klammern ist die Anzahl der Tiere angegeben.

	Einzel-dosis mg/100 g	Zeitpunkt der Verabreichung in Stunden ^{x)}	Glycogen mg/g LFG	TP nMol/Min./g LFG
NaCl			0 (20)	44 ± 34 (10)
Cortisol			7,81 ± 5,6 (35)	185 ± 110 (21)
Cortisol + Mitomy- cin	0,3 i.p.	-14; -1	8,52 (2)	178 (2)
	0,3 oral	-1	7,14 (2)	203 (2)
Cortisol + 5-B-Des- oxyuridin	20 i.p.	-3,5; -1; +1	9,05 (2)	261 (2)
	40 oral	-0,75	8,40 (2)	256 (2)
Cortisol + 5-Fluor- Uracil	8 i.p.	-3,5; -1; +1	11,40 (2)	202 (2)
	10 oral	-0,25	10,60 (2)	181 (2)
	6 i.p.	+1; +1,5	6,13 (4)	141 (4)

^{x)} ein - bedeutet Applikation vor, ein + Applikation nach Cortisol-gabe

waren nämlich die TP-Werte niedriger als bei den Kontrolltieren der gleichen Gruppe. Auch der Mittelwert der TP aller mit diesem Antimetaboliten behandelten Ratten war mit 131 nMol/Minute/g LFG um 30 % niedriger als derjenige sämtlicher 21 Tiere, die im Laufe unserer Experimente nur Cortisol und keinen Hemmstoff bekommen hatten. Bei diesen belief er sich nämlich auf 185 nMol/Minute/g LFG, einen Wert, der von keinem Tier erreicht wurde, das 6-Aza-Uridin bekommen hatte. Aus den genannten Gründen wird man einen leichten inhibitorischen Effekt des 6-Aza-Uridins annehmen dürfen.

2-Thio-Uracil beeinflußt im Gegensatz zu 6-Aza-Uridin die TP nicht, während es die Gluconeogenese eindeutig hemmt. Die Hemmwirkung ist am stärksten, wenn 2-Thio-Uracil 30 Minuten vor oder nach Cortisol verabreicht wird. Unter dieser Voraussetzung kann man mit einer einmaligen Gabe von 3,3 mg/100 g eine vollkommene Unterdrückung der Glycogenbildung erreichen, während

man bei späterer Applikation selbst mit einer höheren Dosis nur noch eine teilweise Hemmung erzielt. Da gerade die Tiere, die 2-Thio-Uracil vor bzw. nach der genannten Frist erhalten hatten und keine oder nur eine unvollkommene Hemmwirkung erkennen ließen, den Hemmstoff nicht oral, sondern i.p. bekommen hatten, ist es nicht ausgeschlossen, daß außer dem Zeitpunkt auch die Art der Verabreichung von Bedeutung für die Wirkung des Antimetaboliten ist.

Tabelle 4

Einfluß von 6-Aza-Uridin und 2-Thio-Uracil auf die Gluconeogenese und die TP-Induktion. Zum Zeitpunkt 0 bekamen die Ratten 5 mg Cortisol/100 g Körpergewicht und wurden 5 Stunden danach getötet. In Klammern ist die Anzahl der Tiere angegeben.

	Einzel-dosis mg/100 g	Zeitpunkt der Verabreichung in Stunden ^{x)}	Glycogen mg/g LFG	TP nMol/Min./g LFG
NaCl			0 (20)	44 ± 34 (10)
Cortisol			7,81 ± 5,6 (35)	185 ± 110 (21)
Cortisol + 6-Aza- Uridin	10 i.p.	-4	7,25 (2)	128 (2)
	10 i.p.	-4; -1; +2	6,85 (2)	115 (2)
	10 oral	-3; -1; +1	9,28 (2)	126 (2)
	10 oral	-1	7,66 (2)	164 (2)
	10 oral	-1; +1	7,75 (2)	148 (2)
	15 i.p.	+1; +1,5	6,68 (4)	135 (4)
Cortisol + 2-Thio- Uracil	3,3 i.p.	-14; -1	7,18 (2)	272 (2)
	3,3 oral	-1,5; -1; -0,5	0 (2)	118 (2)
	3,3 oral	-0,5	0 (2)	163 (2)
	3,3 oral	-0,5; +0,5	0 (2)	161 (2)
	3,3 oral	+0,5	0 (2)	165 (2)
	5,0 i.p.	+1; +1,5	3,29 (4)	145 (4)

^{x)} ein - bedeutet Applikation vor, ein + Applikation nach Cortisol-gabe

3. Puromycin.

Das Antibioticum Puromycin, dessen Molekül einen Adenosinrest enthält, hemmt die Übertragung der Aminosäuren auf die Ribosomen (59). Bei unseren Experimenten mit diesem Stoff haben wir zunächst versucht, durch Verabreichung einer relativ hohen Puromycindosis eine Unterdrückung des Glycogen- und TP-Anstiegs zu erzielen und diese durch Adenosinabgabe wieder aufzuheben. Dabei haben wir auch den Aminosäuregehalt der Leber bestimmt. Die Ergebnisse zeigt Tabelle 5.

Tabelle 5

Einfluß von Puromycin und Adenosin auf die Gluconeogenese, die TP-Induktion und den Aminosäuregehalt der Rattenleber. Puromycin (je 9 mg/100 g Körpergewicht als Einzeldosis) und Adenosin (je 15 mg/100 g als Einzeldosis) wurden jeweils gleichzeitig mit Cortisol (5 mg/100 g) sowie 1,5 und 3 Stunden danach i.p. verabreicht. 5 Stunden nach Cortisolgabe wurden die Tiere getötet. In Klammern ist die Anzahl der Tiere angegeben.

	Glycogen mg/g LFG	TP nMol/Min./g LFG	Aminosäuren ^{x)} µMol/g LFG
NaCl	0,00 (20)	44 ± 34 (10)	
Adenosin	1,60 (3)	54 (3)	42,2 ± 5,1 (3)
Puromycin	0,12 (3)	27 (3)	40,9 (2)
Cortisol	7,60 (3)	135 (3)	49,0 ± 6,8 (3)
Cortisol + Puromycin	0,65 (3)	25 (3)	56,1 ± 5,3 (3)
Cortisol + Puromycin + Adenosin	0,12 (3)	19 (3)	57,6 (2)

^{x)} Mittelwert ± 2s. Die AS wurden mit Perchlorsäure extrahiert.

Wie die Ergebnisse zeigen, kann man mit Puromycin sowohl den Glycogen- als auch den TP-Anstieg vollständig verhindern. Diese Wirkung wird durch Adenosin nicht aufgehoben. Die Menge der freien Aminosäuren der Leber ist nach Cortisol + Puromycin deutlich höher als nach Cortisol oder Puromycin allein. Dieser Befund weist darauf hin, daß unter der Cortisolwirkung eine vermehrte Proteinsynthese stattfindet, die durch Puromycin blockiert

wird, so daß sich freie Aminosäuren anhäufen. Ebenso gut könnte die Aminosäurevermehrung jedoch auch als Substratanhäufung infolge Ausbleibens der Gluconeogenese gedeutet werden. Wenn man annimmt, daß Adenosin keinen Einfluß auf den Aminosäurespiegel der Leber ausübt, so ergibt sich aus diesem Versuch weiterhin eine Erhöhung des Aminosäuregehaltes durch die Wirkung des Cortisols allein.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde die Puromycinwirkung in Abhängigkeit von der Dosis und dem Zeitpunkt ihrer Verabreichung untersucht, um herauszufinden, ob Puromycin ebenso wie Äthionin die Gluconeogenese nur in den beiden ersten Stunden inhibiert. Das Resultat ist aus Tabelle 6 zu ersehen.

Tabelle 6

Einfluß von Puromycin (i.p.) auf die Gluconeogenese und den TP-Anstieg in Abhängigkeit von der Dosis und dem Zeitpunkt der Verabreichung derselben. Zum Zeitpunkt 0 erhielten die Ratten 5 mg Cortisol/100 g Körpergewicht und wurden 5 Stunden danach getötet. In Klammern ist die Anzahl der Tiere angegeben.

	Dosis (mg/100 g) u. Zeitpunkt						Glycogen mg/g LFG	TP nMol/Min./g LFG
	-1	0	1	1,5	2	3		
NaCl							0 (20)	44 ± 34 (10)
Cortisol							7,81 ± 5,6 (35)	185 ± 110 (21)
Cortisol + Puromycin		15					0,0 (2)	61 (2)
		7,5	7,5				0,0 (2)	42 (2)
		7,5	7,5		7,5		0,0 (2)	24 (2)
		6					6,9 (2)	78 (2)
		6		6			8,8 (4)	70 (2)
		6		6		6	7,4 (4)	46 (2)
		9		9		9	0,6 (3)	25 (3)

Wie man sieht, kann man mit einer einmaligen Gabe von 15 mg Puromycin/100 g Ratte zum Zeitpunkt der Cortisolverabreichung sowohl den Glycogen- als auch den TP-Anstieg vollkommen unterdrücken. Das gleiche Ergebnis erzielt man, wenn man jeweils die halbe

Dosis eine Stunde vor und eine Stunde nach dem Cortisol appliziert. Gibt man gleichzeitig mit dem Cortisol nur 6 mg Puromycin/100 g, so wird die TP-Induktion nur noch zur Hälfte, die Glycogenbildung aber gar nicht mehr gehemmt. Auch wenn man 1,5 Stunden später nochmals die gleiche Dosis verabreicht, tritt keine stärkere Hemmung mehr ein. Hieraus ist zu schließen, daß Puromycin in gleicher Weise wie Äthionin die Gluconeogenese und die TP-Induktion nicht mehr beeinflußt, wenn es später als eine Stunde nach der Cortisolgabe verabfolgt wird.

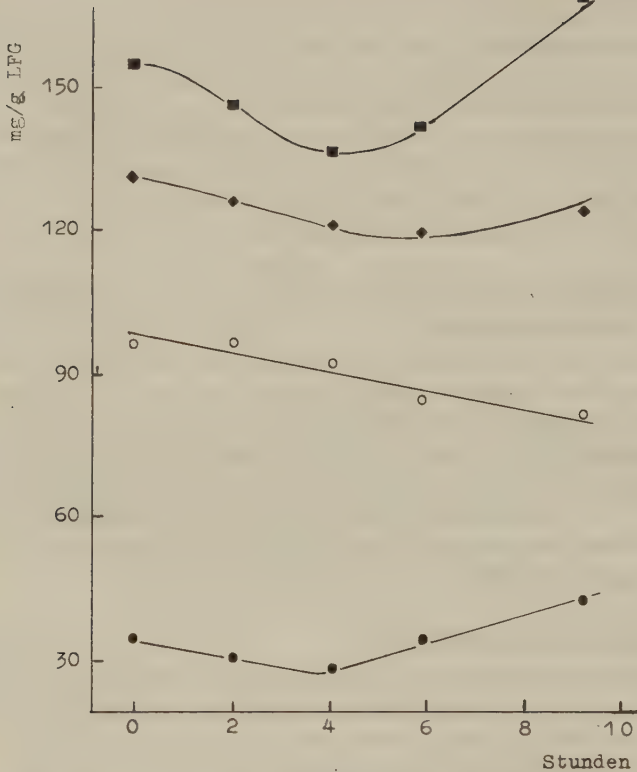
C. Veränderungen des Protein- und Aminosäuregehaltes der Leber während der Gluconeogenese.

Während es durch die Untersuchungen von HÜBENER und Mitarbeitern sehr wahrscheinlich gemacht worden ist, daß die primäre Wirkung des Cortisols auf den Kohlenhydratstoffwechsel in einer Enzyminduktion besteht, ist es noch völlig unbekannt, welche Enzyme, von der TP abgesehen, durch das Hormon induziert werden. Es ist naheliegend, zur Beantwortung dieser Frage die Veränderungen des Gehaltes der Leber an denjenigen Stoffen, die als Substrat für die Gluconeogenese in Frage kommen, zu Rate zu ziehen.

1. Leberalbumin- und-globulingehalt.

HÜBENER hat gefunden, daß in den ersten fünf Stunden nach Cortisolgabe ein statistisch signifikanter Abfall des Leberproteins stattfindet, und daraus geschlossen, daß mindestens ein Teil des neugebildeten Glycogens aus dem verschwundenen Protein entsteht (34). Auch aus unserer Dosiswirkungskurve (Figur 1) ergibt sich, daß der Leberproteingehalt fünf Stunden nach Cortisolverabreichung deutlich niedriger ist als bei den Kontrolltieren. Es stellt sich damit die Frage, ob von dem Proteinverlust in der Leber bestimmte Eiweißkörper bevorzugt betroffen werden.

Um eine Antwort hierauf zu erhalten, haben wir an adrenaletomierten Ratten das zeitliche Verhalten des Leberproteingehaltes in den ersten neun Stunden nach Cortisolgabe verfolgt. Zu diesem Zweck haben wir je zwei Tiere nach 2, 4, 6 und 9 1/4 Stunden getötet und das Gesamtprotein, das cytoplasmatische Protein und den Albuminanteil desselben gesondert bestimmt. Das Ergebnis ist in Figur 2 dargestellt.



Figur 2

Zeitliches Verhalten des Leberproteingehaltes nach Cortisolgabe (5 mg/100 g Körpergewicht) bei adrenalectomierten Ratten. In den ersten drei Tagen nach Adrenalectomie erhielten die Tiere Futter und einprozentige NaCl-Lösung ad libitum. Dann hunger-ten sie 24 Stunden und bekamen darauf Cortisol. Nach weiteren fünf Stunden wurden sie getötet. ■ Gesamtprotein, ◆ cytoplasmatisches Protein, ● cytoplasmatisches Albumin, ○ cytoplasmatisches Globulin.

Das Gesamtprotein und das cytoplasmatische Protein nehmen in den ersten vier bis sechs Stunden ab; danach steigen sie wieder an. Dies entspricht den Befunden an normalen Tieren (34). Die Globulin-

fraktion nimmt während der gesamten Versuchsdauer gleichmäßig ab, die Albuminfraktion jedoch nur in den ersten vier Stunden. Danach nimmt sie wieder zu. In den ersten Stunden nach Cortisolgabe erfolgt also eine gleichmäßige Abnahme beider Fraktionen des cytoplasmatischen Proteins. Der Albuminverlust wird aber etwa von der fünften Stunde an in zunehmendem Maße durch eine verstärkte Albuminsynthese wettgemacht. Diese ist auch die Ursache für den Wiederanstieg des Gesamt- und des cytoplasmatischen Proteins.

2. Aminosäuregehalt der Leber.

Da die Albumine in den Rattenlebermikrosomen aus Aminosäuren synthetisiert werden (10), kann angenommen werden, daß die vermehrte Albuminproduktion die Folge eines vermehrten Aminosäureangebotes ist. Aus diesem Grunde haben wir den Gehalt der Leber an freien Aminosäuren zu Beginn des Wiederanstiegs der Albuminwerte, d.h. also fünf Stunden nach Cortisolverabreichung, bestimmt. Da weiterhin zu vermuten ist, daß ein verstärkter Proteinkatabolismus ebenfalls zu einer Vermehrung der freien Aminosäuren führt, haben wir die Aminosäurekonzentration in der Leber auch zu dem Zeitpunkt ermittelt, an dem der Leberproteingehalt am stärksten abfällt. Dieser Zeitpunkt liegt drei Stunden nach der Cortisolfütterung (34). Die Resultate sind in Tabelle 7 enthalten.

Tabelle 7

Zunahme der Aminosäurekonzentration der Rattenleber nach Cortisolgabe (5 mg/100 g Körpergewicht). Die Aminosäuren wurden mit Tris-Puffer extrahiert. "p" bezieht sich auf den Unterschied zwischen Cortisoltieren und Kontrollen. In Klammern ist die Anzahl der Tiere angegeben.

	$\mu\text{Mol} / \text{g LFG}$ nach	
	3 Stunden	5 Stunden
NaCl	39,6 $\pm$ 11,4 (7)	38,4 $\pm$ 8,0 (10) 43,0 $\pm$ 5,52 (6) ^{x)}
Cortisol	46,7 $\pm$ 11,4 (8)	46,5 $\pm$ 12,3 (10) 49,9 $\pm$ 7,74 (7) ^{x)}
p	< 0,05	< 0,01

x) Aminosäuren mit Perchlorsäure extrahiert.

Die Aminosäurewerte der Tiere, die Cortisol bekommen haben, sind sowohl nach drei Stunden als auch nach fünf Stunden signifikant höher als diejenigen der entsprechenden Kontrolltiere.

3. Leberpeptidasenaktivität.

Da die Aminosäurekonzentrationen zu den genannten Zeiten praktisch völlig identisch sind, läßt sich nicht ermesen, welcher Anteil davon dem Proteinabbau in der Leber und welcher dem verstärkten Aminosäureeinstrom aus der Peripherie (47) zuzuschreiben ist. Zur Klärung dieser Frage haben wir die Peptidasenaktivität, gemessen an der Menge der in der Zeiteinheit in vitro freigesetzten Aminosäuren, als Maß für den Proteinkatabolismus in der Leber bestimmt. In Tabelle 8 sind die Ergebnisse verzeichnet.

Tabelle 8

Peptidasenaktivität in der Rattenleber nach Cortisolgabe (5 mg/100 g Körpergewicht). In Klammern ist die Anzahl der Tiere angegeben. "p" bezieht sich auf den Unterschied zwischen Cortisoltieren und Kontrollen.

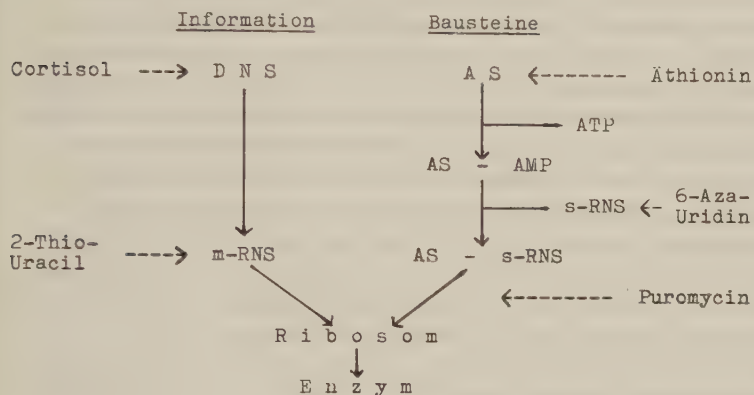
	$\mu\text{mol/Minute/g LFG}$ nach	
	3 Stunden	5 Stunden
NaCl	727 $\pm$ 258 (7)	567 $\pm$ 318 (7)
Cortisol	897 $\pm$ 432 (7)	580 $\pm$ 321 (6)
p	< 0,1	

Wie die Resultate zeigen, findet im Leberhomogenat weder drei Stunden noch fünf Stunden nach Cortisolverabreichung eine verstärkte Freisetzung von Aminosäuren statt. Auch zwischen den Peptidasenaktivitäten nach drei und nach fünf Stunden besteht kein signifikanter Unterschied.

DISKUSSION.

Eine Beurteilung der Ergebnisse der hier beschriebenen Experimente ist nur unter Berücksichtigung des Mechanismus der Protein- also auch der Enzymsynthese, sowie des Angriffsortes der von

unß verwendeten Antimetaboliten in demselben möglich. Aus Untersuchungen an Mikroorganismen hat sich folgendes Bild über den Ablauf der Enzymsynthese ergeben (siehe auch Figur 3):



Figur 3

Schema der Enzymsynthese.

Die unterbrochenen Pfeile zeigen die wahrscheinlichen Angriffsorte der Antimetaboliten und den vermutlichen des Cortisols.

Die Produktionsstätten der Eiweißkörper sind die Ribonucleoprotein-Partikel (RNP-Partikel) des Cytoplasmas, die Ribosomen (43). Die Proteinbausteine sind die Aminosäuren. Jede einzelne von diesen wird durch ein spezifisches Enzym zu Aminoacyl-AMP aktiviert und an eine gleichfalls spezifische lösliche Ribonucleinsäure, sog. s-RNS, gebunden (3). Von dieser wird sie unter Mitwirkung eines weiteren Enzyms auf die Ribosomen übertragen, wo die Aminosäuren nach einem für jedes Protein charakteristischen Muster aneinandergereiht werden. Die Information für dieses Muster liegt in der Struktur der DNS bestimmter Gene in den Chromosomen des Zellkerns begründet (38) und wird den Ribosomen durch bestimmte sehr kurzlebige Ribonucleinsäuren mitgeteilt (8,26). Diese werden auf Grund ihrer Funktion "messenger"-RNS (m-RNS) genannt und sind für jedes zu bildende Protein, also z.B. auch für jedes Enzym, spezifisch.

Die von verwendeten Hemmstoffe greifen an verschiedenen Stellen in diesen Mechanismus ein. Äthionin entfaltet seine Hemmwirkung

wie aus unseren Versuchen hervorgeht, auf Grund seines Antagonismus gegenüber Methionin. Daher ist es sehr unwahrscheinlich, daß es die Gluconeogenese unspezifisch, z.B. toxisch beeinflusst. Wahrscheinlich wird es an Stelle des Methionins in das Enzymmolekül eingebaut, so daß ein unwirksames "Paraenzym" entsteht. Auch STEKOL und WEISS vermuten, daß Äthionin statt Methionin in Proteine eingebaut werden kann (56). Es ist jedoch auch möglich, daß es den Einbau von Methionin in Protein blockiert, ohne selbst inkorporiert zu werden, indem es mit einem den Methionineinbau vermittelndem Enzym einen stabilen Enzym-Substrat-Komplex bildet.

Puromycin verhindert die Übertragung der Aminosäuren auf die Ribosomen (59), indem es die Aminosäuren hydrolytisch von dem AS-s-RNS-Konjugat abspaltet (46), und unterdrückt daher die Proteinsynthese vollständig. In völliger Übereinstimmung hiermit bewirkte es in unseren Experimenten eine komplette Hemmung sowohl der TP-Induktion als auch der Glycogenbildung. Im Gegensatz zu den Verhältnissen beim Äthionin beruht die Wirkung des Puromycins wahrscheinlich nicht auf einem Antagonismus zu einem physiologischen Metaboliten. Zumindest läßt sie sich durch Adenosin, das dem Puromycin in chemischer Hinsicht ähnlich ist, nicht beseitigen. Das war auch nach dem, was über die Wirkungsweise dieses Hemmstoffes bekannt ist, nicht zu erwarten.

Die Nucleinsäure-Hemmstoffe sind wegen ihrer Bedeutung als Inhibitoren des malignen Wachstums in den letzten Jahren gründlich erforscht worden. Daher ist ihre Wirkung auf den Nucleinsäurestoffwechsel z.T. gut bekannt. Mitomycin C hemmt selektiv die DNS-Synthese (54). Darüberhinaus kann es auch bereits gebildete DNS wieder zerstören (51), während es den RNS- und Proteinstoffwechsel nicht beeinflusst (54). 5-Brom-Desoxy-Uridin hemmt bei Säugern den Einbau von Thymidin in DNS (20,40), indem es die Methylierung des Uracils am C-Atom 5 hemmt (40). Auch 5-Fluor-Uracil hemmt bei Mäusen (13) und bei *Escherichia coli* (16) die Thymidinsynthese, indem es zu 5-Fluor-Desoxyuridin-5'-Phosphat umgewandelt wird (13,17), welches die Thymidin-5'-Phosphat-Synthetase hemmt (16). Außerdem beeinträchtigt 5-Fluor-Uracil die RNS-Synthese, weil es infolge Hemmung der Uridinphosphorylase den Einbau von Uracil in RNS unterbindet (55,17). In diese wird es auch selbst eingebaut (13,33), bei Mäusen jedoch nur in ganz

geringem Umfang (13). Bei 5-Fluor-Uracil steht also ebenso wie bei 5-Brom-Desoxyuridin die Wirkung auf den DNS-Stoffwechsel ganz im Vordergrund (31). 6-Aza-Uridin blockiert die Decarboxylierung von Orotidyl-5-Phosphat und behindert dadurch die Uridinsynthese (49). Es wird in s-RNS eingebaut (1) und verhindert bei Säugern die Bindung von Aminosäuren an diese, nicht aber den Aminosäureeinbau in Lebermicrosomen (53). Auch 2-Thio-Uracil wird sowohl von Bakterien (29,30) als auch in der Leber junger Ratten (11) in RNS inkorporiert. Zusammenfassend kann man also sagen, daß 5-Brom-Desoxyuridin (5,20,40) und 5-Fluor-Uracil (13,16,17) ebenso wie Mitomycin C (51,54) ganz überwiegend den DNS-Stoffwechsel stören und die RNS kaum beeinflussen (31), während 6-Aza-Uridin (1,49,53) und 2-Thio-Uracil (11,29,30) in den RNS-Stoffwechsel eingreifen. Die Wirkung dieser Hemmstoffe beruht darauf, daß sie analog dem Athionin entweder als falsche Bausteine in Nucleinsäuren eingebaut werden (1,11,13,29,30,33) oder aber durch Blockierung von bestimmten Enzymen den Nucleinsäureaufbau verhindern (16,17,40,49,53,55).

Die Beurteilung unserer versuche mit Nucleinsäure-Antimetaboliten wird dadurch erschwert, daß die von uns benutzten Uracil-Antagonisten einmal sowohl die RNS- als auch die DNS-Synthese beeinträchtigen und zum anderen in unseren Experimenten entweder nur die Glycogenbildung (2-Thio-Uracil) oder nur die TP-Bildung (6-Aza-Uridin) oder keine von beiden hemmten. Trotzdem ist eine befriedigende Deutung der Ergebnisse möglich. Die ungleiche Beeinflussung der Gluconeogenese und der TP-Induktion läßt sich auf Grund des oben skizzierten Wirkungsmechanismus der Nucleinsäure-Antimetaboliten zwanglos erklären. Eine vollkommene Unterdrückung der Protein- bzw. Enzymsynthese braucht nämlich, die Verabreichung einer genügend hohen Dosis des Hemmstoffes vorausgesetzt, nur dann einzutreten, wenn der Antimetabolit Enzyme blockiert. Wird er jedoch selbst in Nucleinsäuren eingebaut, wie 6-Aza-Uridin und 2-Thio-Uracil, so kann die Bildung von Paraenzymen erfolgen. Diese können je nachdem, ob die für die spezifische Wirkung des jeweiligen Enzyms verantwortlichen Gruppen intakt bleiben oder nicht, biologisch noch mehr oder weniger aktiv sein. So haben GROS und NAONO nachweisen können, daß E. coli unter dem Einfluß von 5-Fluor-Uracil neben einer inaktiven β -Galactosidase eine voll aktive alkalische Phosphatase produziert, die sich aber von

der normalerweise gebildet durch eine größere Thermolabilität unterscheidet (27).

Da bei unseren Experimenten die Einwirkungsdauer der Hemmstoffe auf die Versuchstiere in der Regel nur drei bis acht, maximal 19 Stunden betrug, konnten die Antimetaboliten nur solche Nucleinsäuren beeinflussen, die sich rasch erneuern. Die DNS von Zellen, die nicht gerade in schneller Vermehrung begriffen sind, hat eine mittlere Lebensdauer von mehreren bis vielen Wochen. Daher kann von Mitomycin C, 5-Brom-Desoxyuridin und 5-Fluor-Uracil, die bei Säugern ausschließlich oder ganz überwiegend die DNS-Synthese beeinträchtigen, die Proteinsynthese aber nur geringfügig vermindern (28,32), eine Hemmung der Enzyminduktion nicht erwartet werden. Dementsprechend ließen die genannten Stoffe auch keinen Einfluß auf die Glycogenbildung und den TP-Anstieg erkennen. Die gesamte RNS der Rattenleber hat eine mittlere Lebensdauer von 6,5 Tagen (57). Hierbei dürfte es sich zum großen Teil um s-RNS handeln. Unter Cortisoleinfluß wird der RNS-Umsatz von der zweiten bis zur fünften Stunde zwar um 100 % gesteigert (24), dürfte aber trotzdem noch so klein sein, daß während einer so kurzen Einwirkungsdauer des Antimetaboliten, wie sie bei unseren Versuchen herrschte, nur ein unwesentlicher Prozentsatz der s-RNS verändert werden kann. Immerhin könnte die geringe Hemmung des TP-Anstiegs durch 6-Aza-Uridin auf dem Einbau dieses Stoffes in s-RNS (1) beruhen.

Die vollkommene Unterdrückung der Gluconeogenese durch 2-Thio-Uracil kann jedoch nicht ausschließlich die Folge einer Veränderung der s-RNS sein. Vielmehr kann man annehmen, daß der Hemmstoff auf eine RNS-Fraktion von nur wenigen Stunden Lebensdauer einwirkt, die von REID und STEVENS in der Rattenleber gefunden wurde (52) und wahrscheinlich mit der m-RNS identisch ist. Für die Annahme, daß 2-Thio-Uracil die m-RNS beeinflusst, spricht auch die Tatsache, daß seine inhibitorische Wirksamkeit bereits eine Stunde nach Cortisolgabe deutlich nachläßt. Wir halten es daher für möglich, daß 2-Thio-Uracil als falscher Baustein in die m-RNS eingebaut wird, wodurch den Ribosomen eine falsche Information mitgeteilt wird, so daß Paraenzyme produziert werden, die die Gluconeogenese nicht mehr gewährleisten.

Aus unseren Experimenten mit Hemmstoffen folgt somit, daß man die

Gluconeogenese und den TP-Anstieg sowohl durch solche Antimetaboliten inhibieren kann, die die Übertragung der Aminosäuren auf die Ribosomen in irgendeiner Weise stören (Puromycin), als auch durch solche, die zu einer falschen Information für die Proteinsynthese führen (2-Thio-Uracil).

Diese Ergebnisse können als schwerwiegende Argumente dafür angesehen werden, daß die unter dem Einfluß von Cortisol stattfindende Gluconeogenese eine De-novo-Synthese von Protein zur Voraussetzung hat, die mit großer Wahrscheinlichkeit als Enzyminduktion betrachtet werden kann. Darüberhinaus kann man in der Unterdrückung der Gluconeogenese durch 2-Thio-Uracil, welches vermutlich in m-RNS eingebaut wird, einen Hinweis darauf erblicken, daß Cortisol auf einer Ebene in den Mechanismus der Enzyminduktion eingreift, die der Bildung der m-RNS vorgeschaltet und daher in der DNS der Chromosomen zu suchen ist.

Während demnach die Tatsache einer Enzyminduktion nach Cortisolgabe als weitgehend gesichert anzusehen ist, ist noch unbekannt, welche in den Rahmen der Gluconeogenese gehörenden Enzyme induziert werden. Die Abnahme des Leberproteins, die in den ersten Stunden nach Cortisolfütterung stattfindet, und die gleichzeitige Erhöhung der Aminosäurekonzentration in der Leber lassen vermuten, daß Cortisol unter anderem die Bildung von Enzymen induzieren könnte, die einen Proteinabbau bewirken. Die Untersuchung der Peptidasenaktivität erbrachte jedoch keinen Anhaltspunkt hierfür. In der Leber der mit Cortisol vorbehandelten Tiere wurden nicht mehr Aminosäuren freigesetzt als in der Leber der Kontrolltiere. Dieser Befund, sowie die Tatsache, daß der Aminosäuregehalt der Leber drei Stunden nach Hormongabe ebensohoch ist wie fünf Stunden nach dieser, sprechen dafür, daß der Proteinkatabolismus in der Leber keinen Einfluß auf deren Gehalt an freien Aminosäuren hat. Dieser müßte nämlich sonst nach drei Stunden höher sein als nach fünf Stunden, weil nach unseren wie auch nach früheren Befunden, die von HÜBENER erhoben wurden (34), der Leberproteinabfall drei Stunden nach Cortisolverabreichung am stärksten ist, während zwei Stunden später bereits wieder eine Proteinzunahme zu verzeichnen ist. Die Möglichkeit, daß der Leberproteinverlust nicht auf einem vermehrten Abbau, sondern auf einer verstärkten Ausschüttung in die Blutbahn beruht, ist unwahrscheinlich; denn in den ersten

Stunden der Cortisolwirkung ist der Plasmaproteingehalt überhaupt nicht erhöht, und später sind nur die Plasmaalbumine vermehrt (6). Da der Proteinverlust der Leber in den ersten fünf Stunden nach Applikation von Cortisol aber statistisch gesichert ist (34), halten wir es für möglich, daß bei diesem Eiweißabbau überhaupt keine freien Aminosäuren, sondern aktivierte Derivate von solchen entstehen, die sogleich zur Glycogenbildung verwendet werden.

Das Hauptsubstrat für die Gluconeogenese dürften aber nicht Leberproteine, sondern Aminosäuren sein. Diese sind, wie unsere Versuche zeigen, nach Cortisolgabe in der Leber vermehrt. LEE und WILLIAMS fanden auch zwei Stunden nach Verabreichung von Nebennierenrinden-Extrakt oder Desoxycorticosteron in der Leber eine erhöhte Aminosäurekonzentration (41). Diese dürfte nach dem oben Ausgeführten allein auf einen vermehrten Aminosäureeinstrom zurückzuführen sein, der von NOALL und Mitarbeitern nachgewiesen werden konnte (47). Der Grund hierfür ist in dem durch Cortisol hervorgerufenen gesteigerten Proteinkatabolismus in der Körperperipherie (21,22,42,50), besonders der Muskulatur, zu suchen, der nach etwa zwei Stunden (19,41) zu einer Erhöhung der Aminosäurekonzentration des Plasmas führt (5,19,36,37,41). Die Erhöhung des Aminosäurespiegels überdauert den Glycogenanstieg in der Leber um viele Stunden (19) und ist wahrscheinlich die Ursache für die etwa fünf Stunden nach Cortisolgabe einsetzende verstärkte Albuminproduktion der Leber, die ihrerseits zu einer Vermehrung der Plasmaalbumine (6) führt. Die Folge der verstärkten Albuminsynthese ist schließlich auch eine Zunahme des Gesamtproteins der Leber und damit des Lebergewichtes.

ZUSAMMENFASSUNG.

1. Es wurde eine Dosiswirkungskurve des Cortisols ermittelt, aus der hervorgeht, daß die Glycogenbildung in der Leber bis zu 15 mg Cortisol/100 g Körpergewicht linear mit dem Logarithmus der Dosis ansteigt, während die TP und die Proteinabnahme bereits mit 5 mg maximal stimuliert werden. Unerwünschte pharmakologische Effekte traten nicht auf.
2. Die durch Äthionin hervorgerufene Hemmung der Gluconeogenese kann durch Methionin verhindert werden.

3. Die Gluconeogenese kann durch Hemmstoffe der RNS-, nicht aber der DNS-Synthese unterdrückt werden.
4. Puromycin kann sowohl die Gluconeogenese als auch den TP-Anstieg nach Cortisolgabe vollständig inhibieren.
5. In den ersten vier bis fünf Stunden nach Cortisolverabreichung nehmen die Globuline und Albumine der Leber in gleichstarkem Maße ab. Von der fünften Stunde an erfolgt eine vermehrte Albuminsynthese.
6. Die Peptidasenaktivität der Leber wird durch Cortisol nicht beeinflusst.
7. Der Aminosäuregehalt der Leber ist drei und fünf Stunden nach Cortisolgabe signifikant erhöht.
8. Die gewonnenen Ergebnisse werden als Bestätigung für die Annahme gewertet, daß Cortisol in der Leber eine Enzyminduktion bewirkt, durch die die Gluconeogenese hervorgerufen wird. Es wird vermutet, daß Cortisol direkt an den Genen angreift.
9. Die beobachteten Veränderungen des Aminosäure- und Proteingehaltes der Leber nach Cortisolgabe werden diskutiert.

LITERATURVERZEICHNIS.

1. Askonas, B.A.: in Protein Biosynthesis (ed. R.J.C. Harris), Academic Press, London u. New York 1961.
2. Beisenhertz, G., H.J. Boltze, Th. Bücher, R. Czok, K.H. Garbade, E. Meyer-Arendt u. G. Pfeleiderer: Naturforsch. 86, 555 (1953).
3. Berg, P., F.H. Bergmann, E.J. Offengrand u. M. Dieckmann: J. biol. Chem. 236, 1726 (1961).
4. Bondy, P.K., F.L. Engel u. B.W. Farrar: Endocrinology 44, 476 (1949).
5. Bondy, P.K.: Endocrinology 45, 605 (1949).
6. Bongiovanni, A.M., S.H. Blondheim, W.J. Eisenmenger u. H.G. Kunkel: J. clin. Invest. 29, 798 (1950).
7. Bosch, L., E. Harbers u. Ch. Heidelberger: Cancer Res. 18, 335 (1958).
8. Brenner, S., F. Jacob u. M. Meselson: Nature 190, 576 (1961).
9. Britton, S.W. u. H. Silvette: Am. J. Physiol. 100, 693 (1932).

10. Campbell, P.N., O. Greengard u. B.A. Kernot: *Biochem. J.* 74, 107 (1960).
11. Cantarow, A., T.L. Williams, J. Melnik u. K.E. Paschkis: *Cancer Res.* 18, 818 (1958).
12. Carrol, N.V., R.W. Longley u. J.H. Roe: *J. biol. Chem.* 220, 583 (1956).
13. Chaudhuri, N.K., B.J. Montag u. Ch. Hildesheimer: *Cancer Res.* 18, 318 (1958).
14. Civen, M. u. W.E. Knox: *J. biol. Chem.* 234, 1787 (1959).
15. Clark, J.: *J. biol. Chem.* 200, 69 (1953).
16. Cohen, S.S., J.G. Flaks, H.D. Bauer, M.R. Loeb u. J. Lichtenstein: *Proc. U.S. Nat. Acad. Sci.* 44, 1004 (1956).
17. Danneberg, P.B., B.J. Montag u. Ch. Hildesheimer: *Cancer Res.* 18, 329 (1958).
18. Degenhardt, G., H.J. Hübener u. I. Alester: *Z. physiol. Chem.* 323, 278 (1961).
19. Dubreuil, R. u. P.S. Timiras: *Am. J. Physiol.* 174, 20 (1953).
20. Eidinoff, M.L., J.E. Knoll, B.J. Marano u. D. Klein: *Cancer Res.* 19, 738 (1959).
21. Engel, F.L., S. Schiller u. E.J. Pentz: *Endocrinology* 44, 450 (1949).
22. Engel, F.L.: *Endocrinology* 49, 538 (1951).
23. Feigelson, P., T. Dashman u. F. Margolis: *Arch. Biochem. Biophys.* 85, 478 (1959).
24. Feigelson, P.F., M. Feigelson u. O. Greengard: 1st Int. Congr. Endocr., *Acta Endocr. Suppl.* 51 (1961).
25. Feigelson, M.: *Fed. Proc.* 21, 380 (1962).
26. Gros, F., H. Hiatt, W. Gilbert, C. G. Kurland, R.W. Rieseborough u. J.D. Watson: *Nature* 190, 581 (1961).
27. Gros, F., u. S. Naono: *Symposium Wassenaar 1961 - Protein Biosynthesis*, Academic Press, London u. New York 1961.
28. Hakala, M.T.: *J. biol. Chem.* 234, 3072 (1954).
29. Hamers, R.: *Biochim. Biophys. Acta* 21, 170 (1956).
30. Handschuhmacher, R.E.: *Biochim. Biophys. Acta* 23, 428 (1957).
31. Heidelberger, Ch.: *Cancer Res.* 20, 403 (1960).
32. Horowitz, J., J.J. Saukkonen u. E. Chargaff: *Biochim. Biophys. Acta* 29, 222 (1958).
33. Horowitz, J. u. E. Chargaff: *Nature* 184, 1213 (1959).
34. Hübener, H.J.: *Z. physiol. Chem.* 322, 135 (1961).

35. Hübener, H.J.: Dtsch. med. Wschr. 87, 438 (1962).
36. Ingle, D.J., M.C. Prestrud u. J.E. Nezamis: Proc. Soc. Exp. Biol. 67, 321 (1948).
37. Ingle, D.J., M.C. Prestrud u. J.E. Nezamis: Proc. Soc. Exp. Biol. 75, 801 (1950).
38. Jacob, F. u. J. Monod: J. mol. Biol. 3, 318 (1961).
39. Kendall, E.C.: Vitamines and Hormones 6, 277 (1948).
40. Kit, S., Ch. Beck, O.L. Graham u. A. Gross: Cancer Res. 18, 548 (1958).
41. Lee, N.D. u. R.H. Williams: Proc. Soc. Exp. Biol. 79, 664 (1952).
42. Long, C.N.H., B. Katzin u. E.G. Fry: Endocrinology 26, 309 (1940).
43. Mattaei, H. u. M.W. Nirenberg: Biochem. Biophys. Res. Comm. 4, 404 (1961).
44. Moore, S. u. W.H. Stein: J. biol. Chem. 176, 367 (1948).
45. Moore, S. u. W.H. Stein: J. biol. Chem. 211, 907 (1954).
46. Nathans, D. u. F. Lipman: New York Acad. Sci. 47, 497 (1961).
47. Noall, M.A., T.R. Riggs, U.L.M. Walker u. H.N. Christensen: Science 126, 1002 (1957).
48. Pardee, A.B. u. L.S. Prestridge: Biochim. Biophys. Acta 49, 77 (1961).
49. Pasternak, C.A. u. R.E. Handschuhmacher: J. biol. Chem. 234, 2992 (1959).
50. Pesch, L.A. u. J.H. Clark: Proc. Soc. Exp. Biol. 91, 510 (1956).
51. Reich, E., A.J. Shatkin, E.L. Takim: Biochim. Biophys. Acta 45, 608 (1960).
52. Reid, E. u. B.M. Stevens: Biochim. Biophys. Acta 49, 215 (1961).
53. Rychlik, I.: in Protein Biosynthesis (ed. R.J.C. Harris), Academic Press, London u. New York (1961).
54. Shiba, S., A. Terawaki, T. Taguchi u. J. Kawamata: Nature 183, 1056 (1959).
55. Sköld, D.: Biochim. Biophys. Acta 27, 651 (1958).
56. Stekol, J.A. u. K. Weiß: J. biol. Chem. 185, 577 (1950).
57. Swick, R.W., A.L. Koch u. D.T. Handa: Arch. Biochem. Biophys. 63, 226 (1956).
58. Walter, H.: Nature 188, 643 (1960).
59. Yarmolinsky, M.B. u. G.L. de la Haba: New York Acad. Sci. 45, 1721 (1959).

Ehrenwörtliche Erklärung.

Ich erkläre ehrenwörtlich, daß ich die der Medizinischen Fakultät Frankfurt/Main zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel "Untersuchungen über den Wirkungsmechanismus der Gluconeogenese nach Cortisolgabe bei Ratten" im Institut für vegetative Physiologie zu Frankfurt/Main unter Leitung von Privatdozent Dr. H. J. HÜBENER mit Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- und ausländischen Medizinischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Frankfurt/Main, den 12. März 1963

gez. Eckehart Wiedemann

Lebenslauf.

Am 9. August 1937 wurde ich als Sohn des Volksschullehrers Georg Wiedemann und seiner Ehefrau Lieselotte, geb. Lerp, in Eisenach geboren. Von 1943 bis 1947 besuchte ich die Volksschule und anschließend bis 1950 das humanistische Domgymnasium zu Fulda. 1950 wurde ich Schüler des Aufbaugymnasiums in Fulda. Dort legte ich am 13. Februar 1957 die Reifeprüfung ab. Vom Sommersemester 1957 bis zum Sommersemester 1962 studierte ich an der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität in Frankfurt Medizin. Hier bestand ich am 28. Oktober 1959 die Ärztliche Vorprüfung. 1961/62 war ich zwei Semester lang als wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für vegetative Physiologie der Universität tätig. Am 28. Februar 1963 bestand ich die Ärztliche Prüfung.

Meine akademischen Lehrer waren:

Die Professoren R. Altmann, Amelung, Artelt, Betke, Boenninghaus, Czerny, de Rudder, Herbert Fischer, Frey, H. Frick, Frowein, Gebauer, Geißendörfer, Giersberg, Grüner, Güntz, Halbsguth, Heintz, Heinz, Heller, Herzberg, Hoff, Holtz, Kahlau, Kroneberg, Krücke, Lapp, Luff, H. Martin, Mittermaier, Pfeiffer, Radenbach, Rajewsky, W. Ried, Róka, Rotter, Royen, Sandritter, Schmith, Schümann, Schwenzer, Starck, Thiel, Ungeheuer, weiße und Zutt

sowie die Privatdozenten Brehm, Degkwitz, Heinecker, Hübener, Landes, Lieb, Otto, W. Weber, Westermann und Wiedemann.



